

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001458

International filing date: 14 February 2005 (14.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2004A000255
Filing date: 17 February 2004 (17.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 26 April 2005 (26.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

907 PCT

PCT/EP05/001458



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

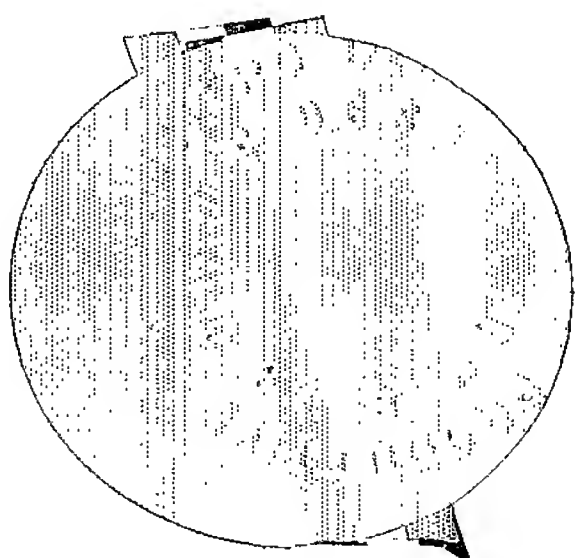
Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000255**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li..... **23 MAR. 2005**



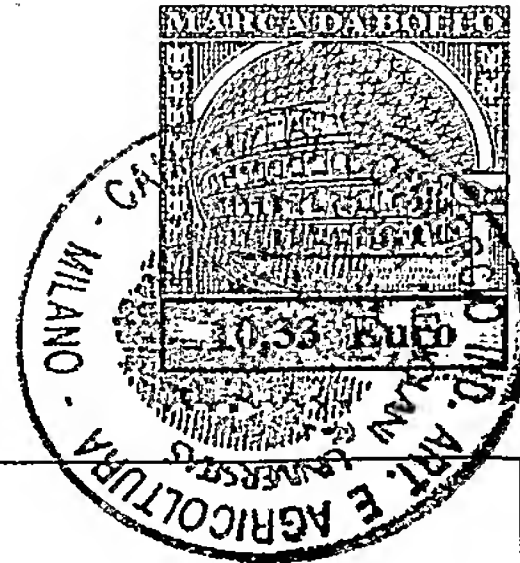
IL FUNZIONARIO

Paola Giuliano
.....
Dr.ssa Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

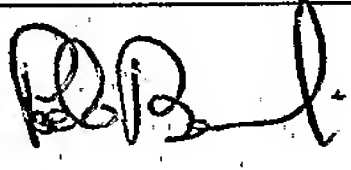
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N **MI 2004 A 0 0 0 2 5 5**

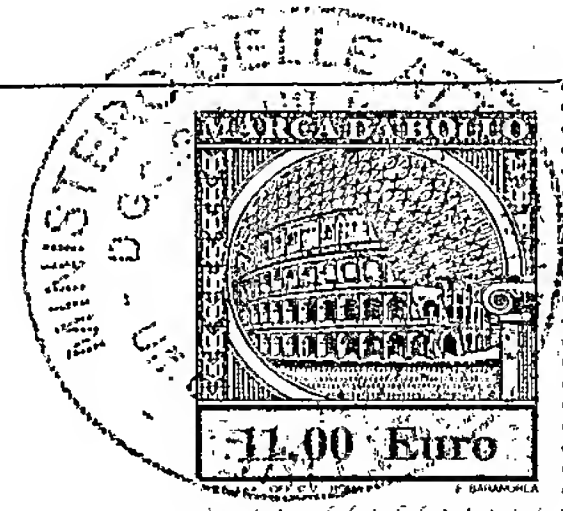


A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 03064870151
INDIRIZZO COMPLETO	A4	MILANO		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	"SOSTANZE AD ATTIVITÀ ANTIANGIOGENICA"		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	FERRERO MARIA ELENA
NAZIONALITÀ	D2	
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BANFI PAOLO 	



MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPOVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART. 76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N. 455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	BIANCHETTI GIUSEPPE ED ALTRI
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	BIANCHETTI BRACCO MINOJA S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Rossini 8
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 MILANO (MI)
TELEFONO		02/76021218
FAX		02/783078 - 02/76024366
E-MAIL		mailbox@scb.it
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	LETTERA INCARICO (CON RISERVA)

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	1		7
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		2
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO.			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	NO		
PROCURA GENERALE			
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE			
	(EURO)		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	CENTOESSANTADUE/69#	
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI		
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO		
DATA DI COMPILAZIONE	17/02/2004		
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BANFI PAOLO		

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 0 0 0 2 5 5	
C.C.I.A.A. DI	MILANO	COD. 15
IN DATA	17 FEB. 2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	00	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE		
IL DEPOSITANTE		L'UFFICIALE ROGANTE

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 0 0 0 2 5 5	DATA DI DEPOSITO:	17 FEB. 2004
A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO			
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO Milano			
C. TITOLO			
"SOSTANZE AD ATTIVITÀ ANTIANGIOGENICA"			

O. RIASSUNTO

Si descrive l'uso di o-ATP come agente farmacologico utile per il trattamento di malattie nella cui insorgenza o progressione è coinvolta l'angiogenesi.

P. DISEGNO PRINCIPALE

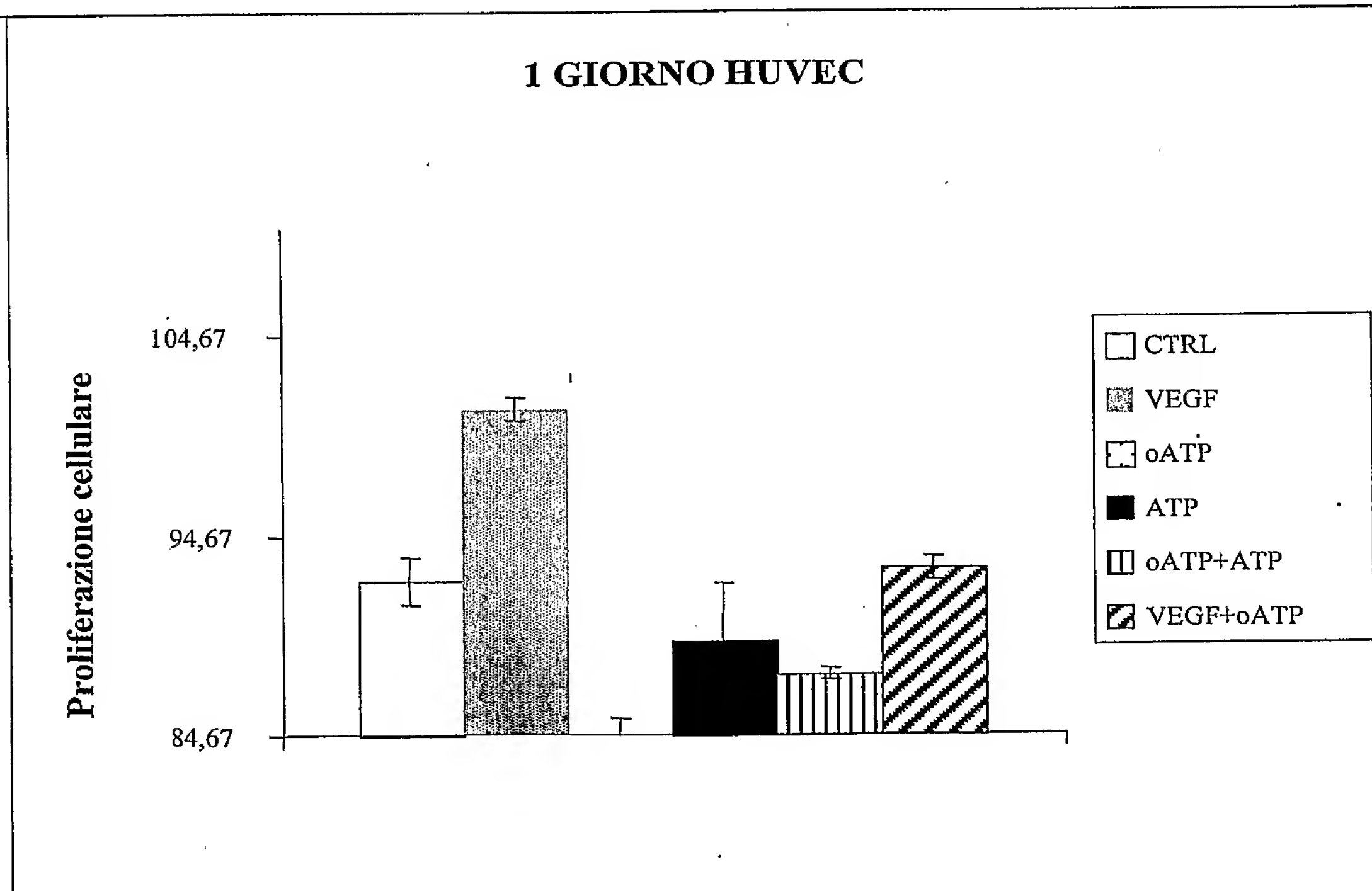
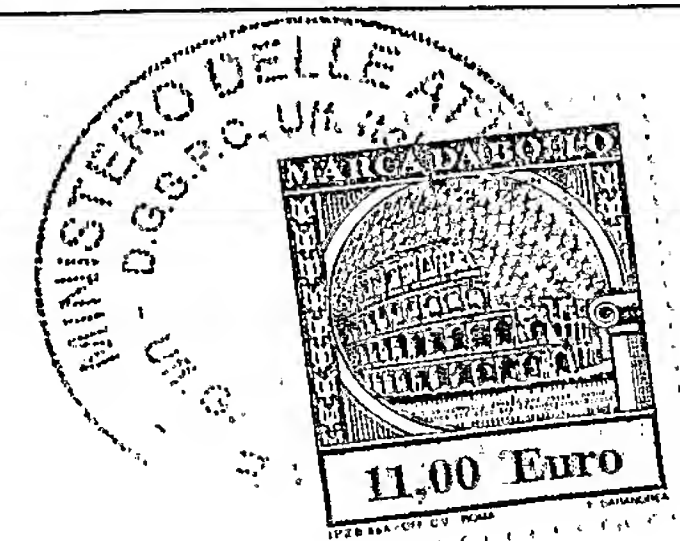


Figura 1

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

BANFI PAOLO

[Handwritten signature]



7201 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

PB/mgg "SOSTANZE AD ATTIVITÀ ANTIANGIOGENICA"

a nome : UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

con sede in : Milano

* * *

MI 2004 A 0 0 0 2 5 5

La presente invenzione riguarda in generale sostanze che agiscono sull'angiogenesi. Più precisamente l'invenzione riguarda l'uso di o-ATP per il trattamento di patologie che richiedono l'inibizione dell'angiogenesi.

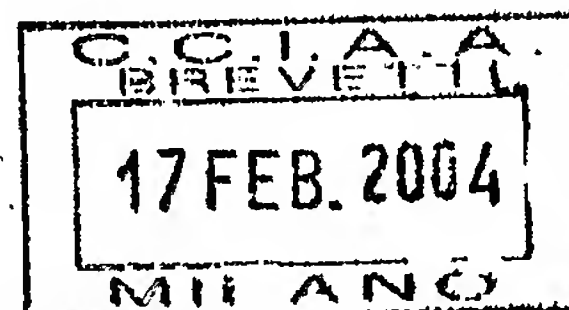
INTRODUZIONE

L'angiogenesi

La proliferazione delle cellule endoteliali è alla base del processo di formazione di nuovi vasi, noto come angiogenesi. I vasi neoformati consentono l'apporto di nutrienti ed ossigeno alle cellule del tessuto in cui si svolge l'angiogenesi. Il processo angiogenetico è di utilità, ad esempio, nel corso della riparazione delle ferite, poiché i tessuti in rigenerazione necessitano di un corretto apporto ematico. Al contrario l'angiogenesi è dannosa nella malattia tumorale, poiché l'apporto ematico facilita la proliferazione delle cellule tumorali. L'inibizione della proliferazione delle cellule endoteliali, o azione anti-angiogenica, riveste quindi un importante significato applicativo nella terapia antitumorale.

Attività biologica di o-ATP

La forma ossidata dell'ATP, nota come o-ATP, è caratterizzata dalla presenza di due gruppi aldeidici nelle posizioni 2' e 3' dell'anello ribofuranosile. Può essere preparata per trattamento dell'ATP con un sale dell'acido periodico, come descritto in P.N. Lowe et al., "Preparation and



chemical properties of periodate-oxidized adenosine triphosphate and some related compounds", Biochemical Society Transactions, vol. 7:1131-1133, 1979.

o-ATP viene comunemente impiegata come marcatore di affinità per i siti nucleotidici enzimatici (Easterbrook-Smith, B., Wallace, J.C. & Keech, D.B. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 125-130), grazie alla sua capacità di reagire con i residui non protonati di lisina presenti nei siti nucleotidici formando basi di Schiff o diidromorfolino-derivati (Colman, R.F. (1990) in The Enzymes - Sigman, D.S., and Boyer, P.D., eds - Vol 19, pp. 283-323, Academic Press, San Diego). La stessa molecola è stata anche usata per studiare l'attivazione delle piastrine e per inibire la stimolazione del muscolo scheletrico di pollo da parte di ATP (Pearce, P.H., Wright, J.M. Egan. C.M. & Scrutton, M.C. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 543-554; Thomas, S.A., Zawisa, M.J., Lin, X. & Hume, R.I. (1991) Br. J. Pharmacol. 103, 1963-1969). Inoltre, in linee cellulari di macrofagi l'o-ATP si è dimostrata in grado di bloccare l'effetto di permeabilizzazione della membrana plasmatica indotto da ATP, di ridurre il livello di idrolisi dell'ATP esogeno da parte delle ecto-ATPasi di membrana, e di inibire gli effetti di rigonfiamento, vacuolizzazione e lisi cellulare indotti da ATP (Murgia et al. The Journal of Biological Chemistry, (1993) by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, inc., Vol. 268, No. 11, pp 8199). Per o-ATP è stata proposta un'attività di antagonista del recettore purinergico P2z/P2X7. Infatti il rilascio (LPS = lipopolisaccaride - dipendente) di IL-1 β (interleuchina 1 β) da parte di cellule microgliali esprimenti P22/P2X7 viene inibito selettivamente da o-ATP (Ferrari D. et al., J. Exp. Med., (1997) Vol. 185, N. 3, Pag. 579-582).

STATO DELL'ARTE

Nella domanda di brevetto WO 02/11737, a nome della stessa richiedente, viene descritto l'effetto antinfiammatorio e analgesico di o-ATP, utilizzando come modello sperimentale l'infiammazione unilaterale della zampa del ratto provocata dall'iniezione intraplantare di adiuvante completo di Freund (CFA).

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

In saggi in vitro su cellule endoteliali ottenute da cordone ombelicale umano (HUVEC), si è trovato che o-ATP induce una significativa riduzione della capacità proliferativa, anche in presenza di un agente mitogeno. L'effetto di o-ATP è risultato superiore a quello indotto dalla vasostatina, una nota molecola anti-angiogenica.

È pertanto oggetto della presente invenzione l'uso di o-ATP nell'inibizione dell'angiogenesi. Più precisamente, l'invenzione fornisce un medicamento contenente o-ATP come principio attivo, utile per il trattamento di malattie nella cui insorgenza o progressione è coinvolta l'angiogenesi. Tra i disturbi mediati da angiogenesi che possono trarre beneficio dal trattamento con o-ATP secondo l'invenzione si citano le malattie oculari da neovascolarizzazione, quali retinopatia diabetica, degenerazione maculare, vitreoretinopatia proliferativa, glaucoma e i tumori, quali carcinomi, linfomi, leucemie, sarcomi, melanomi, gliomi, neuroblastomi e altri tumori solidi.

Per l'uso in terapia, il composto o-ATP può essere formulato con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili, e somministrato per via orale, topica o parenterale. Forme farmaceutiche idonee alle diverse vie di somministrazione comprendono compresse, pastiglie, capsule, granulati,

polveri, supposte, sciroppi, soluzioni, sospensioni, creme, pomate, gel, paste, lozioni, emulsioni, spray. Le composizioni farmaceutiche possono essere preparate come descritto in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., NY, USA, XVII Ed. La quantità di sostanza attiva per unità di dosaggio è compresa tra 0,01 e 100 mg per Kg di peso corporeo, da somministrare una o più volte al giorno, a seconda del tipo e gravità della patologia e dello stato di salute del paziente trattato. Generalmente la dose giornaliera sarà compresa tra 1 e 300 mg, preferibilmente tra 10 e 100 mg.

Secondo un altro aspetto, l'invenzione si riferisce a preparazioni combinate di o-ATP e altre sostanze biologicamente attive per il trattamento di patologie mediate da angiogenesi. Secondo una realizzazione preferita, o-ATP è utilizzato in combinazione con sostanze antitumorali quali alcaloidi, antibiotici, composti citotossici o citostatici, antimetaboliti, agenti antiormonali, agenti alchilanti, peptidi, modificatori della risposta biologica, citochine. I diversi principi attivi possono essere somministrati simultaneamente o separatamente. La scelta della specifica combinazione di principi attivi, del loro dosaggio e modalità di somministrazione, dipende dal tipo di tumore, dalla sua eventuale resistenza al trattamento farmacologico, dalla tolleranza del paziente e da altre variabili da valutare di volta in volta.

Esempio 1 - saggio di proliferazione

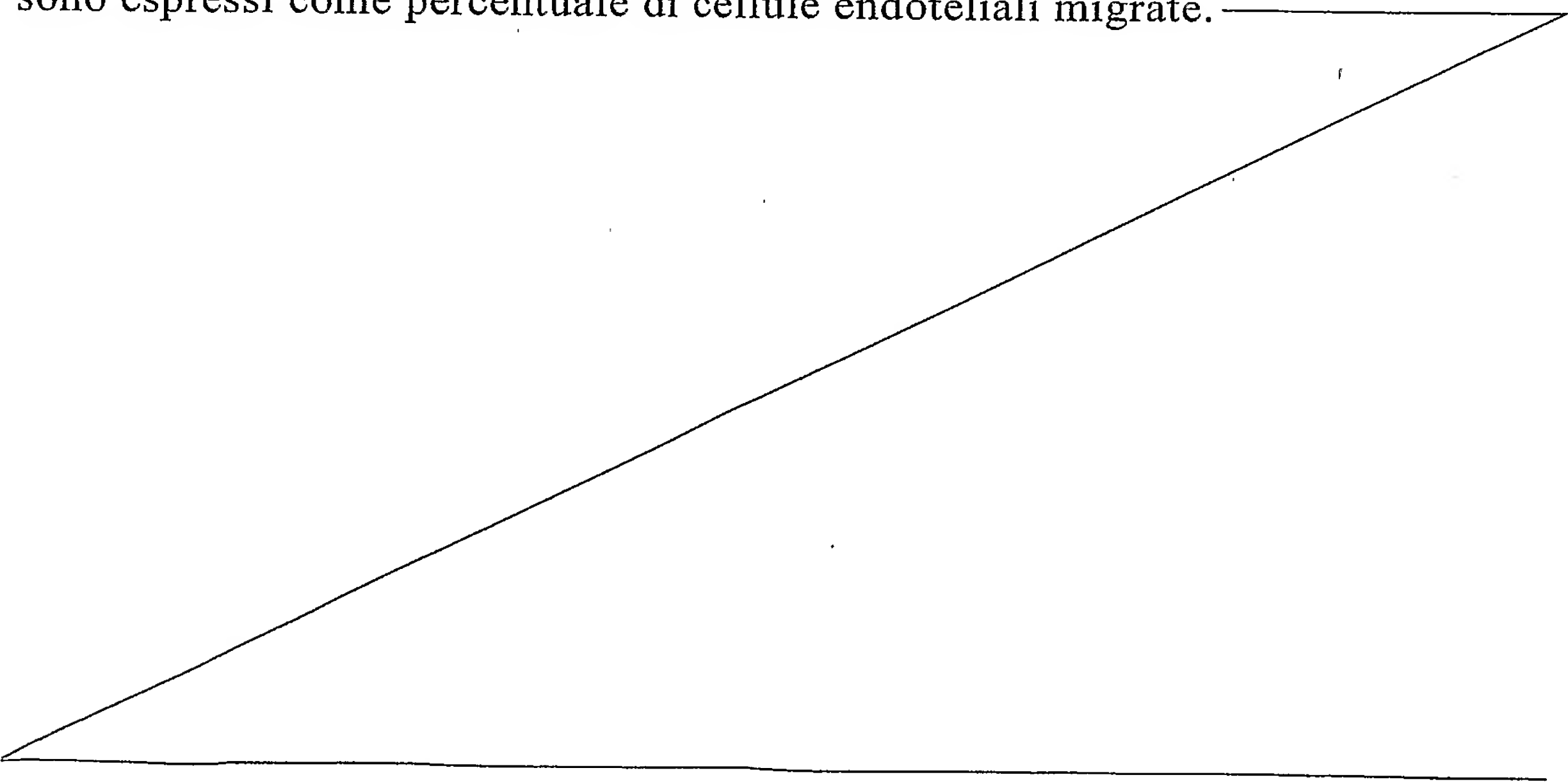
Cellule endoteliali umane (HUVEC) sono state isolate da cordone ombelicale, contate e seminate in numero costante in piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state coltivate come descritto (Jaffe, E.A. (1984) Biology of Endothelial Cells, Martinus Nighoff Publisher, Boston, USA, pp. 1-260), con o senza (controllo) aggiunta di VEGF (50 ng/ml), in presenza di o-ATP



(100 μ M), e di o-ATP+VEGF. Dopo 24 ore di coltura in presenza o in assenza dello stimolo, le cellule sono state lavate e contate al microscopio ottico utilizzando una camera di Burkner. I risultati sono riportati in Figura 1 e rappresentano la media \pm SD di 10 esperimenti.

Esempio 2 - saggio di permeabilità

Sono state utilizzate camere per colture cellulari Transwell (filtri in policarbonato 0,4 μ m, Costar). In breve, cellule endoteliali a confluenza, in monostrato, sono state esposte a VEGF, o-ATP, ATP (3 mM), ATP+o-ATP, o-ATP+VEGF (alle concentrazioni precedentemente indicate) per 1 ora e lavate abbondantemente. È stata aggiunta albumina marcata con 125 I (NEN, Boston, MA) al compartimento superiore; albumina fredda (1,5 mg/ml) è stata aggiunta al terreno di coltura per ridurre al minimo la transitosi. Un'ora dopo l'aggiunta di albumina marcata con 125 I a ciascun pozzetto, sono stati prelevati campioni dal comparto inferiore. La radioattività dei campioni è stata misurata con un contatore gamma (Packard, Sterling, VA). I risultati, riportati in Figura 2, rappresentano la media \pm SD di 10 esperimenti indipendenti e sono espressi come percentuale di cellule endoteliali migrate.



RIVENDICAZIONI

1. Uso del composto o-ATP per la preparazione di un medicamento ad attività antiangiogenica.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, per il trattamento di malattie nella cui insorgenza o progressione è coinvolta l'angiogenesi.
3. Uso secondo le rivendicazioni 1-2, per il trattamento di malattie oculari o tumori.
4. Uso secondo la rivendicazione 3, per il trattamento di carcinomi, linfomi, leucemie, sarcomi, melanomi, gliomi, neuroblastomi.
5. Preparazione terapeutica contenente o-ATP in combinazione con una sostanza antitumorale per uso simultaneo, separato o sequenziale nel trattamento del tumore.
6. Preparazione secondo la rivendicazione 5, dove detta sostanza è scelta tra composti citotossici o citostatici, antimetaboliti, alcaloidi, antibiotici, agenti alchilanti, peptidi, modificatori della risposta biologica, citochine.

Milano, 17 febbraio 2004

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

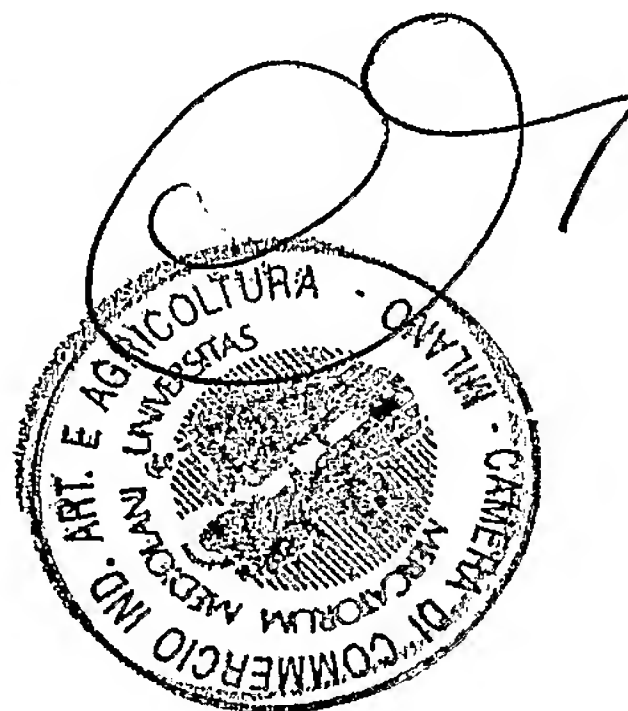
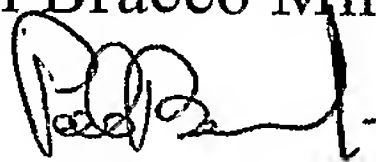
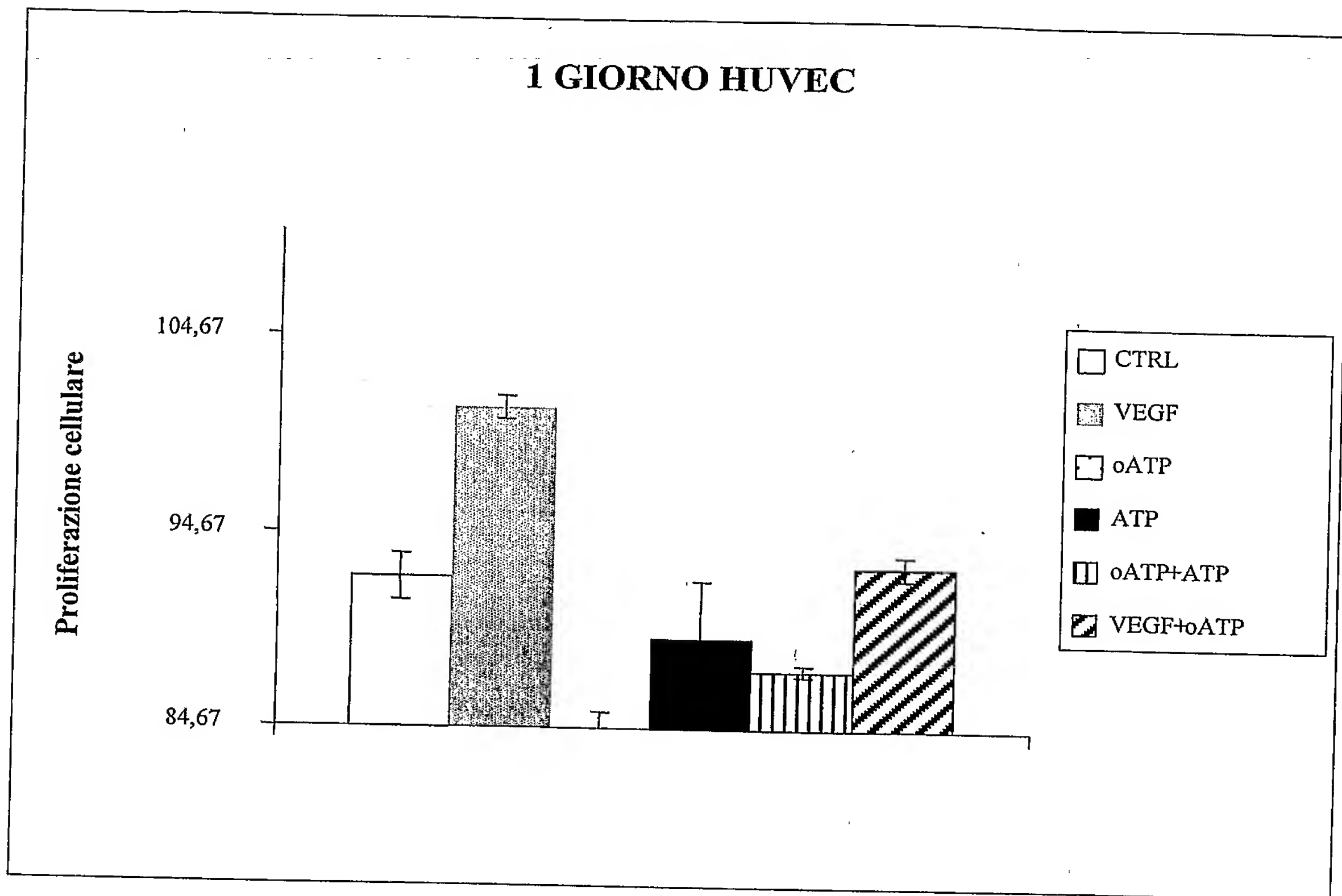


Figura 1



MI 2004 A 0 0 0 2 5 5

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

(Handwritten signature)

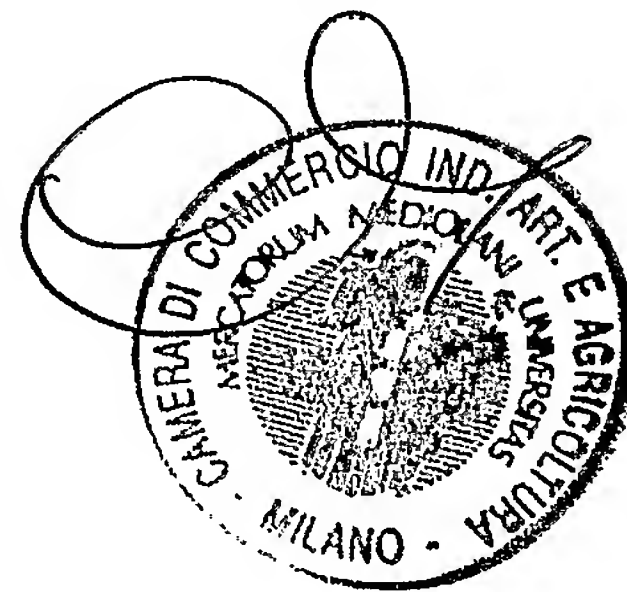
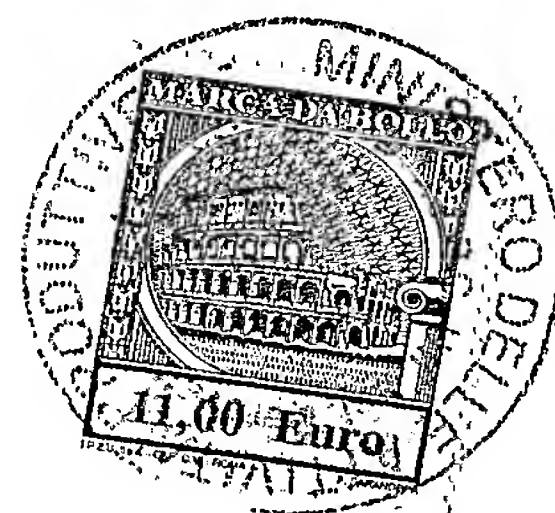
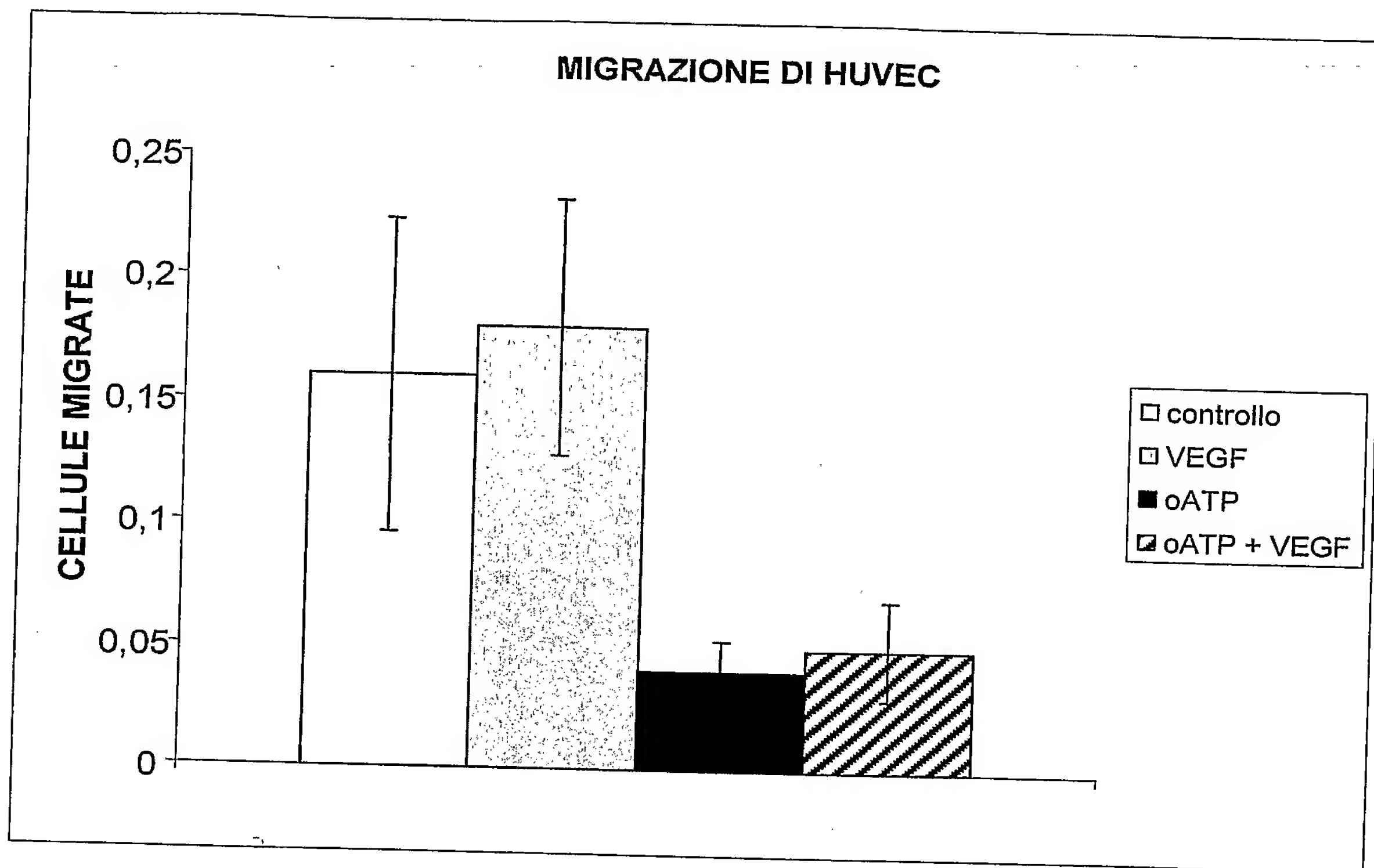


Figura 2



MI 2004 A 0 0 0 2 5 5

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

BB

